

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

THALITA BORGES FERREIRA

CULTIVO EM 3D DE HEPATÓCITOS, ENTERÓCITOS E *EXPLANTS*
INTESTINAIS DE GALINHAS

UBERLÂNDIA

2019

THALITA BORGES FERREIRA

**CULTIVO EM 3D DE HEPATÓCITOS, ENTERÓCITOS E *EXPLANTS*
INTESTINAIS DE GALINHAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Uberlândia, como
requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de
Conclusão de Curso II.

Orientadora: Profa. Dra. Belchiolina Beatriz
Fonseca

UBERLÂNDIA

2019

THALITA BORGES FERREIRA

**CULTIVO EM 3D DE HEPATÓCITOS, ENTERÓCITOS E *EXPLANTS*
INTESTINAIS DE GALINHAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Uberlândia, como
requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de
Conclusão de Curso II.

Uberlândia, 11 de Dezembro de 2019.

Profa. Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca, UFU/MG

Profa. Dra. Vanessa Martins Fayad Milken, UFU/MG

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, UFU/MG

RESUMO

O cultivo celular primário em análise tridimensional (3D), permite melhorar as avaliações celulares como demonstrado em alguns estudos, por exemplo, interações entre micro-organismos e a célula hospedeira e o crescimento de tumores. Além disso, análise tridimensional celular pode ser uma alternativa para pesquisa antes da utilização de animais em estudos *in vivo*. No entanto, não há na literatura relatos da viabilidade de células primárias de embriões de galinhas em cultivo 3D. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo desenvolver um modelo de cultivo primário de enterócito e hepatócito e *explant* de fragmentos intestinais além de avaliar a viabilidade dessas células até 7 dias pós cultivo. Células intestinais e hepatócitos e *explants* de intestino de embriões de galinhas da linhagem Hy-Line entre 17 e 18 dias foram extraídas e cultivadas em monocamadas e 3D. Após 24 horas de cultivo das células e 3 horas do cultivo de *explant*, foram adicionadas nanopartículas magnéticas. As células foram observadas a cada 24 horas tanto em 2D quanto em 3D até 7 dias após o cultivo primário que foi o período em que os hepatócitos começaram a perder a confluência. Os *explants* foram observados 24 horas após a coleta dos fragmentos e analisados quanto a confluência das células e a viabilidade utilizando Iodeto de Propídeo. Os cultivos primários foram viáveis durante todo o tempo de experimento e o *explant* dos fragmentos intestinais não permaneceu viável após 48 horas de adição das nanopartículas, embora as células tenham realizado a aderência destas. Concluiu-se que a cultura mista de enterócitos e fibroblastos assim como a cultura de hepatócitos em 3D podem ser aplicadas em outros estudos posteriores a este trabalho. Em relação ao *explant* de fragmentos intestinais, ainda é preciso avançar quanto aos protocolos de cultivo, meios a serem utilizados, padronização de técnicas para que haja sucesso na viabilidade dos *explants* a serem cultivados.

Palavras-chave: Cultivo celular. Embrião de galinha. Células intestinais. Fígado.

ABSTRACT

The primary cell culture in three-dimensional analysis (3D) allows to improve cell evaluations as shown in some studies, for example, interactions between microorganisms and the host cell and tumor growth. In addition, three-dimensional cellular analysis can be an alternative before use animals for in vivo studies. However, there are no reports in the literature of the viability of primary cells of chicken embryos in 3D cultivation. Thus, this work aimed to develop a model of primary culture of enterocyte and hepatocyte and explant of intestinal fragments in addition to evaluate the viability of these cells up to 7 days post culture. Intestinal cells and hepatocytes and intestine explants from embryos of Hy-Line chickens between 17 and 18 days were extracted and cultured in monolayers and 3D. After 24 hours of cell culture and 3 hours of explant culture magnetic nanoparticles were placed. The cells were observed every 24 hours in both 2D and 3D up to 7 days after primary culture which was the period when hepatocytes began to lose confluence. Explants were observed 24 hours after fragment collection and analysed into the cell confluence and viability using Propidium Iodide. The primary cultures were viable throughout the experiment and the explant of the intestinal fragments did not remain viable after 24 hours of nanoparticle addition, although the cells phagocytized them. It was concluded that mixed enterocyte and fibroblast culture as well as 3D hepatocyte culture can be applied in other studies after this work. About the explant of intestinal fragments, it is still necessary to advance regarding the cultivation protocols, means to be used, standardization of techniques for the viability of the explants to be cultivated.

Keywords: Cell culture. Chicken embryo. Intestinal cells. Liver.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVOS	8
2.1 Objetivos Gerais	8
2.2 Objetivo Específico	8
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
3.1 Histórico	9
3.2 Tipos de cultivo	10
3.3 Metodologias de cultivo.....	11
3.4 Aplicações do cultivo celular	12
4 MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Cultivo de células primárias e <i>exlpants</i> intestinais	13
4.2 Cultivo primário celular em 3D por método de levitação eletromagnética	14
4.3 Cultivo <i>explant</i> primário em 3D por método de levitação eletromagnética.....	15
5 RESULTADOS	16
5.1 Cultivo primário de hepatócitos e enterócitos	16
5.2 Cultivo celular primário – 24 horas pós-adição de NanoShuttles™-PL	17
5.3 Cultivo celular primário – 72 horas pós-adição de NanoShuttles™-PL	18
5.3 Cultivo <i>explant</i> primário 48 horas após adição de NanoShuttles™-PL	20
6 DISCUSSÃO	21
8 CONCLUSÕES.....	23
REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

O cultivo celular é um conjunto de técnicas que mantêm as células vivas *in vitro* de modo que haja uma preservação das características do tecido de origem (NONES, 2009). Utilizando um meio adequado para obtenção do crescimento celular específico desejado, evita-se o crescimento de células não especializadas que desempenham variadas funções (ALVES; GUIMARÃES, 2010). Para realizar este processo, é necessário considerar as seguintes etapas: aquisição da amostra; isolamento tecidual; obtenção das células por métodos de desagregação enzimática ou mecânica, ou por meio de migração celular de um fragmento tecidual; e o cultivo celular em meios e condições adequadas (FRESHNEY, 2010, p.163-186).

A utilização da técnica de cultivo celular tem uma grande aplicabilidade e importância na área laboratorial, especialmente para a virologia, genética e fisiologia celular (TEIXEIRA; VIRGINIO, 2004). Com o passar dos anos, o avanço dos métodos utilizados seguiu juntamente ao desenvolvimento laboratorial e assim, procedimentos como produção de proteínas recombinantes, manutenção de cepas virais e métodos para diagnóstico são realizados com esse modelo experimental (CAMARGOS et al., 2008).

Existem diversos métodos para cultivo celular *in vitro*, podendo ser citados o cultivo em monocamada e o cultivo tridimensional (3D), este último sendo utilizado para morfologias tumorais, por exemplo, por ser mais fidedigno ao tecido maligno, devido às características de interacionais de célula com célula, célula com o substrato e avaliação da cultura e dimensão volumétrica (SABINO, 2014). O cultivo em monocamada faz com que haja uma perda da organização tridimensional do tecido de origem e assim, o cultivo em 3D permite que as células hajam da maneira que fariam em seus tecidos e órgãos de origem (GARCÍA, 2013).

Como métodos de cultivo celular tridimensional, tem-se o de matriz extracelular que utilizam matrizes em gel, suportando a estrutura tridimensional e o método de levitação eletromagnética, que utiliza de nanopartículas que dão as células propriedades magnéticas e são levitadas por indução do magnetismo (SABINO, 2014).

O cultivo celular tridimensional por levitação eletromagnética foi o método utilizado neste trabalho e, embora ainda pouco explorado, o cultivo tridimensional também é uma alternativa para se avaliar a interação de bactérias ou protozoários e a célula hospedeira, principalmente sobre as ferramentas de invasão de microrganismos. Não só as células mas também os *explants*

poderiam ser alternativas para pesquisas antes do uso de animais. O uso de células e *explant* poderiam diminuir o número de animais em trabalhos *in vivo* por permitir a realização de trabalhos mais definitivos nos animais.

Em se tratando de pesquisas com parasitos gastrointestinais, hepatócitos e enterócitos são as células de eleição e avaliar o tempo de vida dessas células e/ou *explant* desses tecidos após a levitação magnética em laboratório é de extrema importância para futuros estudos com microrganismos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver um modelo de cultivo primário tridimensional de enterócitos, hepatócitos e *explants* intestinais de embriões de galinhas.

2.2 Objetivo Específico

- Verificar o tempo de vida dos *explants* intestinais em cultivo 3D pela técnica da levitação eletromagnética;
- Verificar o tempo de vida dos hepatócitos e enterócitos em cultivo 3D pela técnica da levitação eletromagnética;
- Padronizar a técnica de cultivo primário em 3D para trabalhos futuros.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Histórico

O cultivo celular teve seu início no século XX, consistindo em técnicas com fragmentação mecânica dos tecidos e imergindo estes em tubos com fluidos dos animais que originaram as amostras teciduais, como por exemplo, a linfa . Por mais de 50 anos, devido a estas primeiras técnicas, o cultivo celular inicialmente foi nomeado de cultivo de tecidos. Observar o comportamento celular fora do organismo em um ambiente controlado laboratorialmente era o objetivo desejado (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Harrison foi o pioneiro em 1907 a realizar a cultura de células, mimetizando as condições necessárias para a sobrevivência de células nervosas do tubo medular de um embrião de sapo, mergulhando estas na linfa fresca do próprio animal, a qual passou pelo processo de coagulação e após este acontecimento, o tubo foi selado com parafina. Vale ressaltar, que foram mantidas condições assépticas para evitar interferências e contaminações e como vantagem, foi a não-necessidade de controle de temperatura devido a espécie animal escolhida ser ectotérmica— os anfíbios. A manutenção das células vivas *in vitro* por mais de uma semana fez com que outros pesquisadores se interessassem mais no cultivo (ALVES; GUIMARÃES,2010).

Alexis Carrel, em 1912, desenvolveu um modelo de cultivo celular com células cardíacas de um embrião de galinha utilizando as informações de Harrison, mostrando a importância da troca dos meios constantemente para renovar os nutrientes disponíveis para as células e maior sobrevivência das células *in vitro* por períodos mais longos (ALVES; GUIMARÃES, 2010). Porém, mesmo com o avanço do cultivo celular com os passar dos anos, as células eram cultivadas em meios indefinidos que não atendiam as necessidades específicas para o crescimento das células animais, sendo tais meios constituídos de uma combinação de soro e extrato embrionário. Visto isso, em 1955 Harry Eagle realizou sistematicamente uma análise dos nutrientes necessários para as células animais poderem crescer *in vitro*. Eagle estabeleceu duas linhagens celulares: células HeLa e uma linhagem de fibroblastos de camundongo denominadas células L. Realizando variações sistemáticas, ele conseguiu cultivar as células em uma mistura de sais, carboidratos, aminoácidos e vitaminas, suplementando com proteínas do soro. A experiência teve um grande impacto no avanço do cultivo celular, fazendo assim com que o meio que Eagle desenvolveu, se tornasse o meio básico utilizado no cultivo de células

animais até os dias atuais e permitindo os estudos de uma ampla variedade celular (COOPER; HAUSMAN, 2007).

3.2 Tipos de cultivo

O termo cultivo celular é utilizado para nomear um conjunto de técnicas realizadas para manter as células vivas *in vitro* preservando a maioria as características fisiológicas do tecido de origem (NONES, 2009). Utilizando um meio adequado para obtenção do crescimento celular específico desejado, evita-se o crescimento de células não especializadas que desempenham variadas funções (ALVES; GUIMARÃES, 2010). A aquisição da amostra, o isolamento tecidual, a obtenção das células por métodos de desagregação enzimática ou mecânica, ou por meio de migração celular de um fragmento tecidual são etapas que devem ser consideradas e efetuadas corretamente para realização do cultivo celular em meios e condições adequadas (FRESHNEY, 2010, p. 163-186).

O cultivo celular primário consiste de uma mistura de células advindas de um fragmento de tecido desagregado mecanicamente ou por enzimas. As células sobreviventes a este processo e que mantêm as características genótípicas e fenotípicas do tecido que a originou, são denominadas células primárias (TEIXEIRA; VIRGINIO, 2004). Estas células têm um período de vida curto, geralmente são heterogêneas e possuem uma baixa taxa de replicação e então, ao realizar o processo de tripsinização e repique das células, as sobreviventes ao processo e que têm melhor replicação, são chamadas de culturas secundárias (PHILIPPEOS et al., 2012). Já as células que se multiplicam indefinidamente, constituem as células da linhagem celular e, caso passem por alguma mudança genética, são chamadas de células transformadas (ALVES; GUIMARÃES, 2010; CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2012). Em síntese, as células primárias são as células obtidas após o isolamento das células e antes da realização da primeira subcultura que, ao fazer a primeira passagem, dá origem às células secundárias, enquanto as células de linhagem celular surgem após o subcultivo das células primárias e realização de várias passagens, podendo existir células de fenótipos diferentes ou semelhantes (FRESHNEY, 2010, p. 187-206).

Vale ressaltar que podem ser realizados os *explants* primários, que consistem de uma porção de um tecido que foi coletada em um ambiente asséptico e então são retirados pequenos pedaços para cultivar em um meio ideal e em um período curto de tempo (MINCHEVA-NILSSON et

al., 2016). Esse tipo de cultivo é utilizado quando há a necessidade de informações específicas de determinados tecidos (ANTONI et al., 2015).

3.3 Metodologias de cultivo

Para o cultivo celular *in vitro*, existem diversos métodos, como por exemplo, o cultivo em monocamadas (2D) e o cultivo tridimensional (3D) (SABINO, 2014). Entretanto, apesar do cultivo bidimensional ser utilizado rotineiramente nas pesquisas, o comportamento celular em monocamada faz com que haja uma perda da organização tridimensional do tecido de origem e, com isso, a cultura celular em 3D permite uma melhor aproximação das funções fisiológicas devido ao microambiente que fica disponível para as células (AOKI et al., 2016).

A adesão das células em uma superfície plana, a qual serve de suporte mecânico para as células, é a condição na qual depende o cultivo em 2D. Ao crescer em monocamadas, as células possuem crescimento e proliferação homogêneos devido ao acesso uniforme aos nutrientes, porém, não há controle do formato celular. Quando é realizada a cultura em 3D, as características interacionais de célula com célula, célula com o substrato influenciam no comportamento celular e seu formato ligado às funções dos órgãos de origem (DUVAL et al., 2017).

Como métodos de cultivo celular em 3D, tem-se o de matriz extracelular utilizando matrizes em gel que suportam a estrutura tridimensional e o método de levitação eletromagnética, que utiliza de nanopartículas (NanoShuttle™-PL) que dão as células propriedades magnéticas e estas são levitadas por indução do magnetismo. A cultura das células que receberam as nanopartículas ocorre de modo que haja um magneto na parte superior da placa que irá iniciar a levitação destas células (SABINO, 2014).

Realizando uma comparação entre o método de cultivo em 2D e o 3D, nota-se que no cultivo tridimensional a polarização celular é descrita mais precisamente, há uma maior estabilidade e maior tempo de sobrevivência celular, maior tempo de cultivo e há uma melhoria nas análises relacionadas a resposta celular a estímulos, proliferação celular, invasão dos tecidos circundantes por células tumorais, dentre outras. Visto isso, o cultivo em 3D tem maior aplicabilidade quando se almeja a realização de um estudo a longo prazo (ANTONI et al., 2015).

3.4 Aplicações do cultivo celular

A utilização da técnica de cultivo celular tem alta aplicabilidade e importância na área laboratorial, especialmente para a virologia, genética e fisiologia celular (TEIXEIRA; VIRGINIO, 2004). Com o passar dos anos, os avanços da metodologia utilizada, assim como o desenvolvimento laboratorial, seguiram juntos. A produção de proteínas recombinantes, métodos para diagnóstico e manutenção de cepas virais são realizadas utilizando desse modelo experimental (CAMARGOS et al., 2008).

A manutenção de cepas virais por meio do cultivo celular é um meio alternativo para a produção de vacinas atenuadas de mamíferos, pois é um sistema mais simples e flexível do que os ovos aviários SPF (*Special Patogens Free*) fertilizados e podem ser controlados por um período mais prolongado e, caso ocorra alguma pandemia, tem-se a possibilidade de uma produção rápida das vacinas atenuadas desejadas, sendo utilizadas as células de linhagem celular originárias de embriões de galinhas ou codornas, por exemplo (FARZANEH et.al, 2017).

O cultivo celular tem sua aplicabilidade ao tratar-se de pesquisas com parasitos gastrointestinais, utilizando amplamente enterócitos originários de embriões de galinhas para o estudo da coccidiose devido ao epitélio intestinal ser o tecido alvo primário deste parasita (DIMIER-POISSON; BOUT; QUÉRE, 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Genética e no Laboratório de Nanobiotecnologia, ambos da Universidade Federal de Uberlândia. Todos os instrumentos que foram utilizados para realização da técnica passaram por esterilização em autoclave, assim como os meios utilizados foram mantidos aquecidos em temperatura ambiente de 37°C em banho-maria para evitar choque térmico.

Foram obtidos 15 ovos de embriões de galinha da linhagem Hy-Line com 17 e 18 dias da Granja Planalto na cidade de Uberlândia, Minas Gerais. Os ovos tiveram a superfície externa desinfetada com álcool 70% e quebrados delicadamente na extremidade mais larga, abertos com tesoura de ponta fina e os embriões foram retirados e colocados em Placas de Petri. Após a eutanásia por decaptação, realizou-se uma abertura no abdômen com lâminas de bisturi estéreis para retirada dos órgãos na seguinte ordem: fígado e intestino, os quais foram colocados em PBS (Tampão fosfato salino ou *Phosphate Buffered Saline*) sem cálcio e sem magnésio. Como o trabalho foi realizado em embriões, segundo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), não é necessário a apreciação de um Comitê de Ética em Pesquisa com animais.

4.1 Cultivo de células primárias e *exlpants* intestinais

Para o cultivo celular fragmentos de fígado e intestinos foram homogeneizados em agitador magnético para retirada das hemácias que ficaram no sobrenadante. Esse processo foi repetido até que o tampão (PBS) adicionado aos fragmentos de tecidos não apresentasse mais a coloração avermelhada. Para a obtenção das células, os fragmentos foram intensamente cortados com lâmina de bisturi e após, foi utilizada a metodologia de desagregação enzimática, com uma solução de tripsina a 0,25% sobre agitação eletromagnética por 10 minutos. Após esse período, foi realizada uma homogeneização seguida de agitação eletromagnética por 3 minutos. Realizado este processo, um período de 10 minutos foi aguardado para decantação do material.

O sobrenadante resultado da decantação foi acrescentado ao meio 199 (Gibco™) enriquecido com 10% soro fetal bovino (SFB), e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. Outros ciclos de tripsinização foram realizados nos intestinos e fígados remanescentes para aproveitar ao máximo as células. Para a tripsinização, utilizou-se tripsina a 0,25% e esperou-se

3 minutos até as células se soltarem. Após esse tempo, foi adicionado Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) enriquecido com 20% de SFB para inibir a tripsinação e realizou a centrifugação de 1000 rpm por 10 minutos.

Os *peletts* foram adicionados a meio 199 enriquecido com 10% de SFB, 1% de anfotericina B (250uG/mL), gentamicina (50mG/mL), estreptomicina (10.000 mcg/mL) e penicilina (10.000UI/mL) e filtrados em gazes estéreis. O filtrado foi homogeneizado e realizou-se a contagem do número de células em Câmara de Newbauer em aumento de 40x (Microscópio Biológico Óptico da Olympus ©).

Foram colocadas $5,3 \times 10^7$ células em garrafas para cultivo celular de 75 cm², incubados a 41°C em estufa de CO₂ por 70 minutos. Essa fase favorece a obtenção de um cultivo com menor quantidade de fibroblastos. Após a incubação, o sobrenadante foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. Os *pellets* foram colocados em tubos de ensaio com meio 199 enriquecido com SFB a 10% e 1% anfotericina B, estreptomicina e penicilina. Após esta etapa, foi realizada uma segunda contagem por meio da microscopia óptica convencional em Câmara de Newbauer.

Nas garrafas para cultivo celular foi adicionada uma nova solução composta por meio 199, 10% de SFB, 1% de anfotericina B, estreptomicina e penicilina. Em cada garrafa havia um total de $3,12 \times 10^7$ de células do fígado e $1,43 \times 10^7$ de células intestinais. Para cada tipo de célula havia 7 garrafas de cultivo 2D em monocamada e 3 garrafas para cultivo 3D. A incubação foi realizada em estufa de CO₂ a 41° C por 24 horas.

No dia seguinte, foi adicionado mais 1 ml de meio 199 e incubado nas mesmas condições. A partir do segundo dia o meio foi substituído diariamente e as garrafas avaliadas em microscópio invertido.

4.2 Cultivo primário celular em 3D por método de levitação eletromagnética

Após 24 horas do cultivo primário celular, colocou-se 150 µl de NanoShuttles™-PL por garrafa com células intestinais e do fígado. As garrafas em monocamadas foram mantidas para ambos os tecidos. Após aproximadamente 6 horas, realizou-se a tripsinização e as células foram plaqueadas em placas de baixa aderência celular com 12 poços com $5,2 \times 10^6$ de células de fígado por poço e $2,39 \times 10^6$ de células intestinais por poço e em seguida colocou-se a placa

magnética por cima. Foi avaliada a formação da monocamada, a formação e a organização das células em 3D a cada 24 horas e testada a viabilidade do cultivo 96 horas.

Para trocar o meio a cada 24 horas, colocou-se a placa magnética por baixo e esperou-se em torno de 5 minutos para as células descenderem e, em seguida, foi realizada a troca do meio que estava por cima das células.

4.3 Cultivo *explant* primário em 3D por método de levitação eletromagnética

Fragmentos intestinais foram retirados da porção de jejuno de 3 embriões sendo que cada fragmento era de aproximadamente 1,5mm. Após, colocaram-se os *explants* em microplacas de 6 poços (Eppendorfs©) com meio 199 acrescidos de 10% de SFB e 1% de penicilina, estreptomicina e anfotericina B. Em cada poço foi adicionado 125 µl de NanoShuttles™-PL e incubou em estufa de CO₂ em 41°C. Após 48 horas, os *explants* foram marcados com iodeto de propídeo para avaliação da viabilidade.

4.4 Avaliação da viabilidade celular e dos *explants*

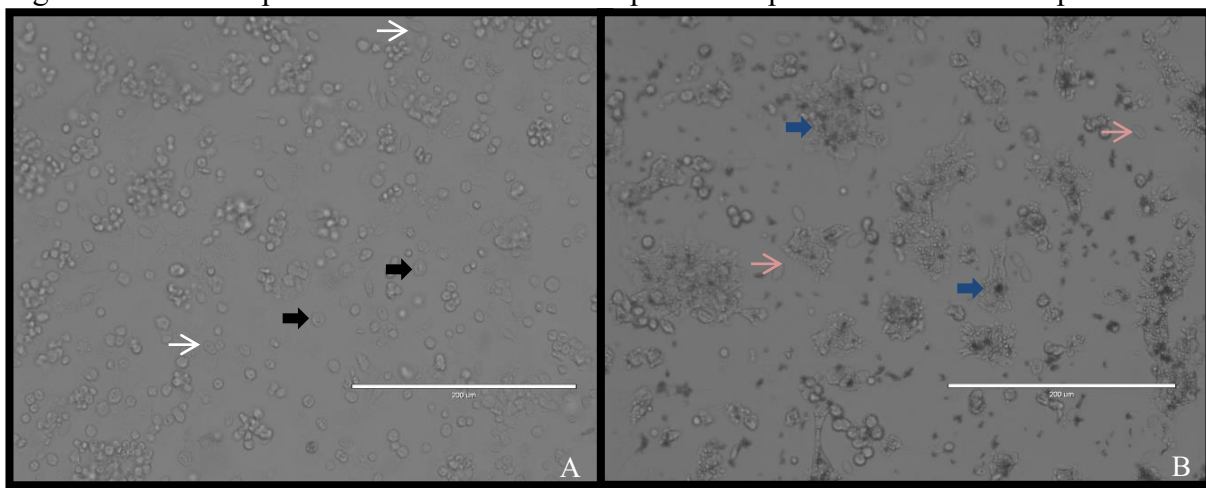
As células foram monitoradas quanto a aderência (monocamadas), estruturas a cada 24 horas e confirmada a viabilidade às 96 horas. A viabilidade dos *explants* também foi avaliada. Para o teste de viabilidade foi utilizado iodeto de propídeo na concentração de 1:100 e incubados por 40 minutos a temperatura de 41°C em estufa de CO₂ a cada 24 horas durante 7 dias. Como controle positivos, uma amostra mista de enterócitos e fibroblastos foi tratada com formol para que houvesse a morte celular e, ao acrescentar o Iodeto de Propídeo (PI), as células mortas fossem marcadas pelo marcador fluorescente e aparecessem na coloração vermelha na microscopia de fluorescência. O mesmo procedimento foi realizado com *explants* 48 horas após adição das nanopartículas.

5 RESULTADOS

5.1 Cultivo primário de hepatócitos e enterócitos

Após 4 horas da realização do cultivo celular, já foi possível observar aderência de parte dos hepatócitos e enterócitos, porém especialmente no caso dos enterócitos, era difícil a identificação das células. Já a identificação dos hepatócitos foi possível após 4 horas (Figura 1). Como o esperado é a aderência precoce dos fibroblastos em relação às outras células apenas o sobrenadante dessa garrafas foram usados e o material aderido foi descartado.

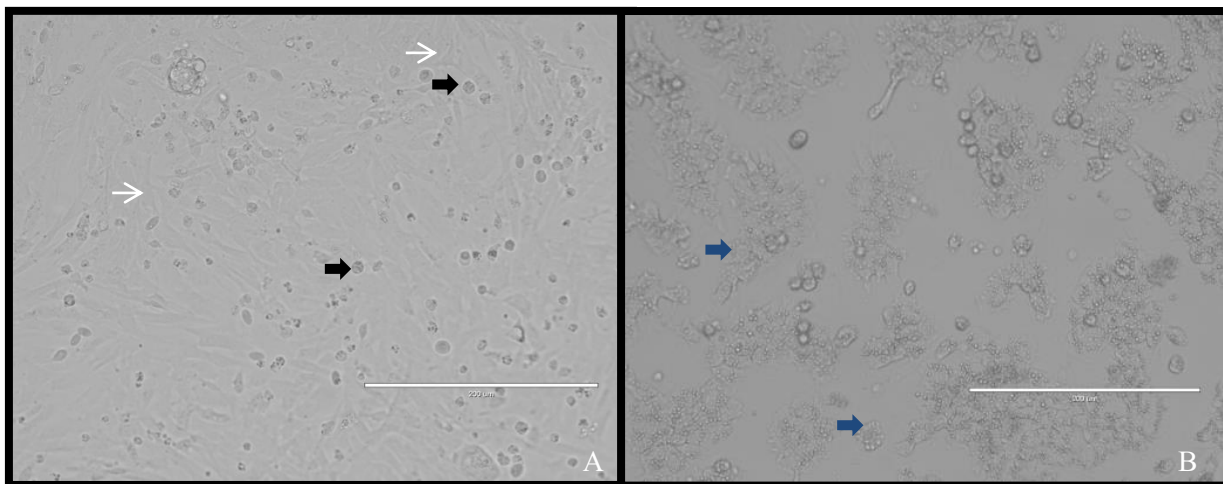
Figura 1 – Culturas primárias de enterócitos e hepatócitos após 4 horas de cultivo primário.



A cultura de células intestinais está representada na figura A, na qual, estão presentes hemácias (setas brancas) e células intestinais ainda não-diferenciadas (setas pretas). Na figura B, está representada a cultura de células do fígado, onde as setas azuis indicam os hepatócitos enquanto as setas rosas indicam as hemácias presentes.

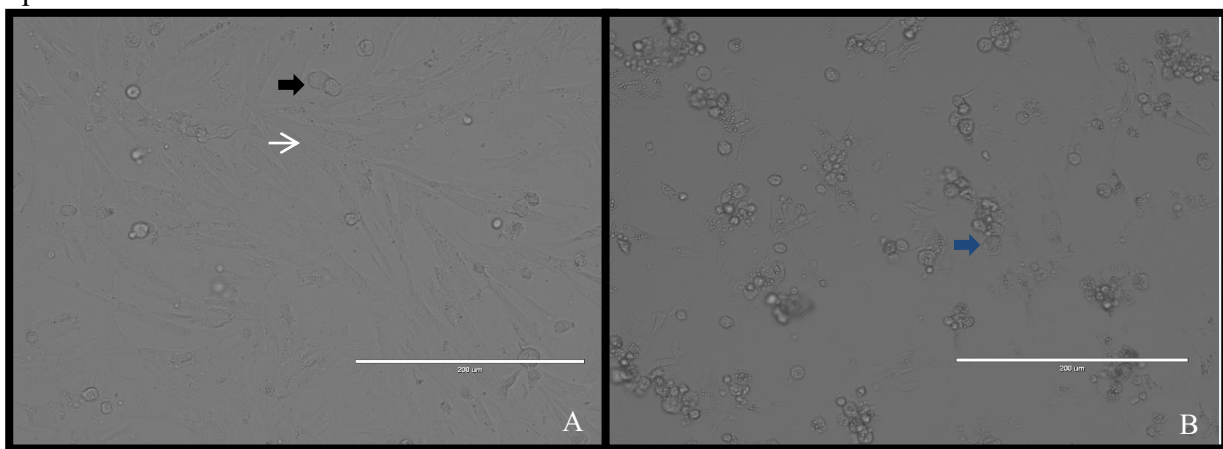
Os cultivos celulares foram analisados diariamente para acompanhar a proliferação e viabilidade celular. As culturas permaneceram viáveis após 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a extração, sendo observada uma proliferação ativa de fibroblastos de forma difusa pelo cultivo de enterócitos enquanto no cultivo de hepatócitos houve a predominância das células desejadas para a cultura (Figuras 2 e 3).

Figura 2 – Cultura primária mista de enterócitos e fibroblastos e cultura primária de hepatócitos após 24 horas.



Fonte: Arquivo pessoal. Na figura A pode ser observada a cultura mista de enterócitos (setas pretas) e fibroblastos (setas brancas). Na figura B, os hepatócitos predominantes na monocamada celular (setas azuis).

Figura 3 – Cultura primária mista de enterócitos e fibroblastos e cultura primária de hepatócitos após 96 horas.



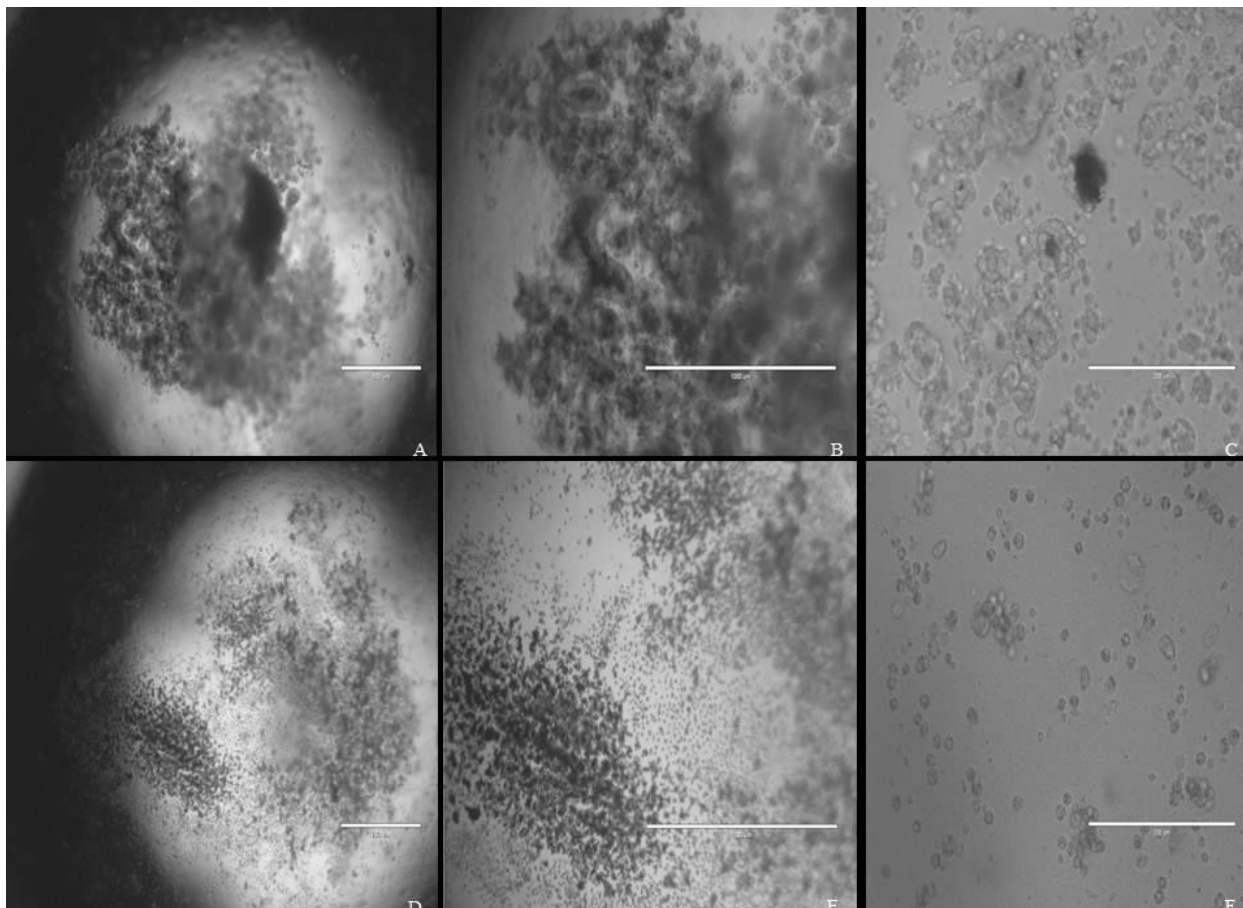
Fonte: Arquivo pessoal. Na figura A pode ser observada a cultura mista de enterócitos (seta preta) e fibroblastos (seta branca). Na figura B, os hepatócitos (seta azul).

5.2 Cultivo celular primário – 24 horas pós-adição de NanoShuttles™-PL

Os cultivos em monocamadas foram utilizados como base para os cultivos 3D e após 24 horas dos cultivos 2D, foram adicionadas nanopartículas, realizada a levitação das células, incubação a 41°C, em estufa de CO₂ por 24 horas, somando um total de 48 horas após a

extração. Nesta primeira análise pós adição de NanoShuttles, foi constatada a aderência das nanopartículas e proliferação e aglomeração celular em ambas as culturas (Figura 4).

Figura 4 – Cultura primária de hepatócitos e cultura primária mista de enterócitos e fibroblastos 24 horas pós-adição das NanoShuttlesTM-PL.

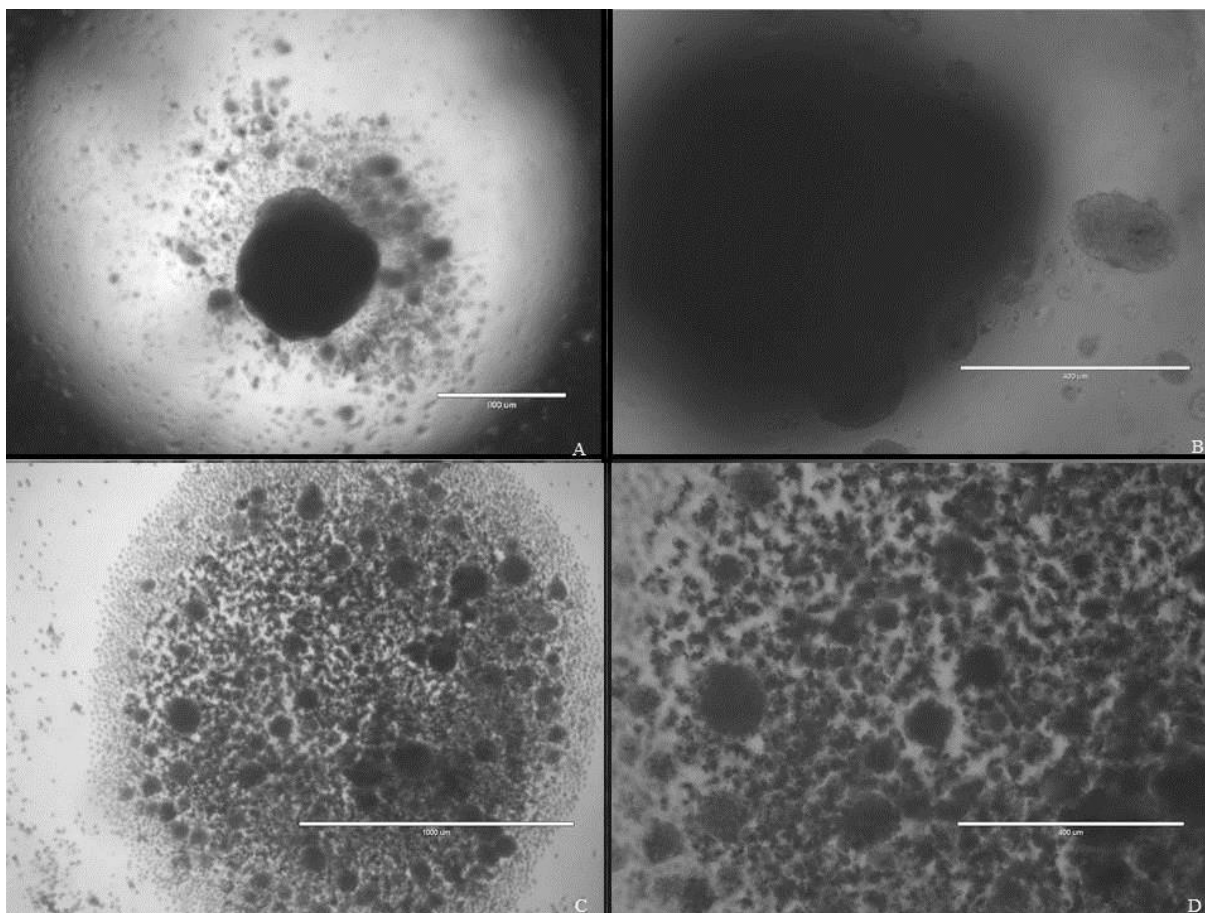


Fonte: Arquivo pessoal. Hepatócitos com nanopartículas aderidas e apresentando aglomeração (A,B) e hepatócitos em monocamadas (C) . Nanopartículas aderidas porém com menor aglomeração celular de fibroblastos e enterócitos (D,E) e enterócitos em monocamadas (F).

5.3 Cultivo celular primário – 72 horas pós-adição de NanoShuttlesTM-PL

Realizando análises diárias e mantendo as condições de incubação similares aos dias anteriores, após 72 horas da adição das nanopartículas, foi notado o aumento da proliferação celular e da aderência das NanoShuttlesTM-PL e uma maior confluência celular formando estruturas sobrepostas nos poços analisados (Figura 5).

Figura 5 – Cultura primária de hepatócitos e cultura primária mista de enterócitos e fibroblastos 72 horas pós-adicação das NanoShuttles™-PL e 96 horas após o cultivo primário.



Fonte: Arquivo pessoal. Hepatócitos aglomerados formando uma estrutura densa sobreposta (A,B) e aglomeração celular em menor quantidade porém com estruturas sobrepostas de fibroblastos e enterócitos (C,D).

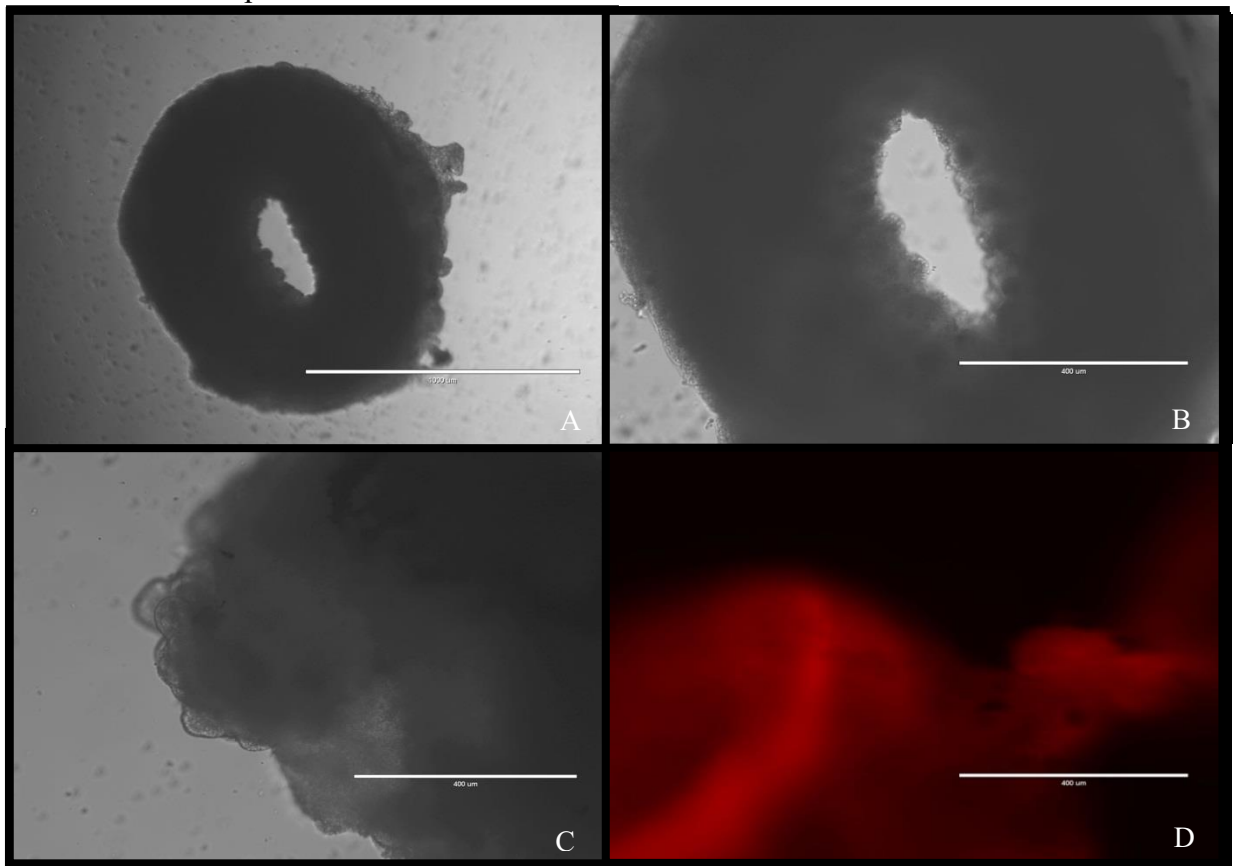
Com os controles existentes de monocamadas no 2D, notou-se que a aderência em monocamadas e as estruturas celulares foram mantidas até 7 dias após adição das nanopartículas quando hepatócitos permaneceram viáveis, porém, após esse período houve o início da destruição da monocamada e perda das estruturas celulares. A viabilidade foi analisada por comparação com o controle positivo, que quando marcadas pelo Iodeto de Propídeo significa que sofreram necrose e com os danos na membrana celular há a penetração do marcador e visibilidade da coloração vermelha no microscópio de fluorescência.

O cultivo de enterócitos não foi avaliado com sucesso nesse trabalho já que foi observada a presença dos fibroblastos. Dessa forma esse cultivo foi tratado como misto e como não era o objetivo desse trabalho um cultivo misto, essas células foram acompanhadas até 7 dias pois percebeu-se que a cada dia o número fibroblastos aumentava.

5.3 Cultivo *explants* primário 48 horas após adição de NanoShuttles™-PL

Os *explants* de intestino foi analisado após aproximadamente 51 horas da extração e 48 adição das NanoShuttles. Realizada a análise após adição de NanoShuttles™-PL foi notado que houve aderência das nanopartículas e a manutenção a estrutura densa tridimensional, porém, ao testar a viabilidade celular, o *explant* sofreu marcação, indicando que houve a morte celular (Figura 6).

Figura 6 – *Explant* de enterócitos após 48 horas com NanoShuttles™-PL e Teste de viabilidade com Iodeto de Propídeo.



Fonte: Arquivo pessoal. Em A,B e C nota-se que as nanopartículas aderiram-se às células e as células mantiveram o formato de uma estrutura densa tridimensional, enquanto em D a coloração avermelhada mostra que as células não estão viáveis devido a penetração do marcador.

6 DISCUSSÃO

O protocolo utilizado neste trabalho para cultivo celular de hepatócitos demonstrou ser capaz de manter as células vivas por até 7 dias sem perder as suas características. Assim, a partir da padronização da metodologia neste trabalho é possível realizar estudos de cultivo primário de hepatócitos em 3D. Segundo Freshney (2010, p. 11-23) a sinalização devido ao contato das células entre si leva a ligações mais fortes entre estas. E então, por sobreviver em um período maior o cultivo de hepatócitos pode ser indicado para estudos com microrganismos do trato gastrointestinal, suas interações com a célula do hospedeiro e seu mecanismo de invasão celular. Neste estudo não foram realizados repiques destas células, porém, esse procedimento pode ser realizado em pesquisas posteriores.

Não foi possível nesse trabalho a formação de um cultivo primário de enterócitos. Dessa forma o cultivo foi tratado como misto que não era o objetivo do trabalho. Pela experiência desse grupo de estudo, cultivos de fibroblastos extraídos de embriões de galinhas podem sobreviver até 21 dias e ainda suportam repiques. Mas como não era o objetivo um cultivo misto essas células foram acompanhadas até 7 dias pois percebeu-se que a cada dia o número de enterócitos diminuía em relação a predominância dos fibroblastos.

No estudo realizado por Kaiser et al.(2017) foi observado que as células epiteliais intestinais embrionárias de galinhas sobreviveram com as características epiteliais por um período de 9 dias e que, mesmo após o crescimento de fibroblastos, o cultivo tem aplicação para outros estudos, como por exemplo, para analisar infecções parasitárias gastrointestinais e interação entre o parasita e a célula do hospedeiro. No presente estudo foi verificado que havia uma quantidade grande de fibroblastos no cultivo misto porém, não foi objeto de análise verificar se essa cultura já era suficiente para um estudo de infecção por micro-organismos que parasitam o trato gastrointestinal. Assim, outros estudos a respeito da viabilidade de um cultivo misto de enterócitos e fibroblastos em pesquisas com micro-organismos se faz necessário.

O uso de *explants* oferece um ambiente mais controlado e mais fácil de manipular mantendo a complexidade das diferenciações observadas *in vivo*, se torna interessante e com maior aplicabilidade para estudos que antes utilizavam nas análises uma grande quantidade de animais, pois há uma diminuição do uso de modelos *in vivo* (RANDALL;TURTON;FOSTER,2011).

O cultivo de *explant* associado ao modelo 3D poderia ser um avanço no estudos laboratoriais por se aproximar da complexidade tecidual. No entanto, nesse trabalho, observou-se que após 48 horas da adição de NanoShuttles™-PL, o *explant* de enterócitos apesar da aderência das nanopartículas e do início da migração radial das células, não sobreviveu. Essa migração radial ocorreu devido as células permanecerem ligadas à matriz extracelular (HENDIJANI, 2017). A necrose celular pode ter ocorrido devido a quantidade insuficiente de nutrientes disponíveis, presença das nanopartículas ou outra limitação relacionada ao fato de não haver uma padronização das técnicas. Ainda há a necessidade de estudos acerca do protocolo de obtenção e cultivo de *explants* de embriões para que haja uma viabilidade maior *in vitro* e aumento da funcionalidade deste modelo para estudos.

8 CONCLUSÕES

Concluiu-se com esse trabalho que é possível trabalhar com cultivo primário de hepatócitos e cultivo misto de enterócitos e fibroblastos em 3D até 7 dias após a extração do tecido embora devam ser realizados novos estudos acerca do uso de nanopartículas e a sobrevivência das células, e técnicas para cultivo primário de enterócitos devem ser melhor padronizadas. O uso de *explants* intestinais não são viáveis já que esse tecido morre 48 horas após a sua extração.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E.A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. *In*: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Org.). Cultivo Celular. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010. v. 2, cap. 5, p. 215-253. ISBN 978-85-98768-41-0. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/iciet/8659/2/Livro%20EPSJV%20010023.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2019.
- ANTONI, D. Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 5517-5527, 11 mar. 2015. DOI 10.3390/ijms16035517. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25768338>>. Acesso em: 12 out. 2019.
- AOKI, Shigehisa et al. Progress in cell culture systems for pathological research. **Pathology International**, [S. l.], v. 66, n. 10, p. 554-562, 7 jul. 2016. DOI 10.1111/pin.12443. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27477924>>. Acesso em: 13 out. 2019.
- CAMARGOS, M. F. et al. APLICAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA DETECÇÃO DE Mycoplasma spp NA ROTINA DE CULTIVOS CELULARES. **Ciência Animal Brasileira**, Minas Gerais, v. 9, n. 3, p. 786-790, jul./set. 2008.
- CARNEIRO, J.; JUNQUEIRA, L. C. Tecnologia da Biologia Molecular: Alguns Exemplos. *In*: _____. **Biologia Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. cap. 2, p. 21-39.
- COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. Uma visão geral das células e da pesquisa celular: Ferramentas da Biologia Celular. *In*: _____. **A célula: Uma abordagem molecular**. Tradução de Maria Regina Borges-Osório 3. ed. Brasil: ARTMED EDITORA LTDA., 2007. cap. 1, p. 20-39. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=PMg6DQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=cultura+de+c%C3%A9lulas+animais+cooper&ots=UL3GS-yRFN&sig=beh1umlv3gjzHsJ-xfbEzKrS2ko#v=onepage&q=cultura%20de%20c%C3%A9lulas%20animais%20cooper&f=false>>. Acesso em: 10 out. 2019.
- DIMIER-POISSON, I. H.; BOUT, D. T.; QUÉRE, P. Chicken Primary Enterocytes: Inhibition of Eimeria tenella Replication After Activation with Crude Interferon- γ Supernatants. **Avian Diseases**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 617-624, 1 jan. 2004. DOI 10.1637/7180-031604R. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15529984>>. Acesso em: 14 out. 2019.
- DUVAL, K. et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. **Physiology (Bethesda)**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 266–277, 14 jun. 2017. DOI 10.1152/physiol.00036.2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2861531>>. Acesso em: 13 out. 2019.
- FARZANEH, M. et al. Avian embryos and related cell lines: A convenient platform for recombinant proteins and vaccine production. **Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 1-10, 9 mar. 2017. DOI 10.1002/biot.201600598. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28371379>>. Acesso em: 13 out. 2019.

FRESHNEY, R. I. Biology of Cultured Cells. *In: _____*. **Culture of Animal Cells: MANUAL OF BASIC TECHNIQUE AND SPECIALIZED APPLICATIONS**. 6. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010. cap. 2, p. 11-23. ISBN 978-0-470-52812-9.

FRESHNEY, R. I. Primary Culture. *In: _____*. **Culture of Animal Cells: MANUAL OF BASIC TECHNIQUE AND SPECIALIZED APPLICATIONS**. 6. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010. cap. 11, p. 163-186. ISBN 978-0-470-52812-9.

FRESHNEY, R. I. Subculture and Cell Lines. *In: _____*. **Culture of Animal Cells: MANUAL OF BASIC TECHNIQUE AND SPECIALIZED APPLICATIONS**. 6. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010. cap. 12, p. 187-206. ISBN 978-0-470-52812-9.

GARCÍA, S. C. Cultivo de células en 3D: La nueva dimensión de los cultivos celulares. **Cuadernos del Tomás**, Espanha, n. 5, p. 215-232, 2013. Disponível em: <<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4462495>>. Acesso em: 10 out 2019.

HENDIJANI, F. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. **Wiley - Cell Proliferation**, [S. l.], v. 50, n. 2, p. 1-14, 3 jan. 2017. DOI 10.1111/cpr.12334. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28144997>>. Acesso em: 18 out. 2019.

KAISER, A. *et al.* Establishment of an In Vitro Intestinal Epithelial Cell Culture Model of Avian Origin. **Avian Diseases**, [S. l.], v. 61, n. 2, p. 229-236, 27 fev. 2017. DOI 10.1637/11524-110216-Reg.1. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28665724>>. Acesso em: 14 out. 2019.

MINCHEVA-NILSSON, L. *et al.* Isolation and Characterization of Exosomes from Cultures of Tissue Explants and Cell Lines. **Current Protocols in Immunology**, [s. l.], v. 115, p. 14.42.1-14.42.21, 1 nov. 2016. DOI 10.1002/cpim.17. Disponível em: <<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cpim.17>>. Acesso em: 11 out. 2019.

NONES, J. Contribuição da técnica de cultivo celular de mamíferos para o desenvolvimento de tecnologias médico-veterinárias. **PUBVET**, Londrina, v. 3, ed. 3, 3 jan. 2009.

PHILIPPEOS, C. *et al.* Introduction to Cell Culture. *In: MITRY, R. R.; HUGHES, R.D.* **Human Cell Culture Protocols: Methods in Molecular Biology**. 3. ed. [S. l.]: Humana Press, 2012. v. 806, cap. 1, p. 1-12. ISBN 9781617793677. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/978-1-61779-367-7>>. Acesso em: 11 out. 2019.

RANDALL, K. J.; TURTON, J.; FOSTER, J. R. Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. **Cell biology and toxicology**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 267-284, 8 mar. 2011. DOI 10.1007/s10565-011-9187-5. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21384137>>. Acesso em: 17 out. 2019.

SABINO, L. G.. **Estudo da distribuição de doses limiares em TFD para um modelo de cultura tridimensional de células obtido pelo método de levitação eletromagnética**. 2014. 114 p. Tese (Doutorado - Pós-Graduação em Física Aplicada Molecular) - Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2014. Disponível em:<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/76/76132/tde-03022015-164253/publico/LuisGustavoSabino_DO_corrigida.pdf>. Acesso em: 10 out. 2019.

VIRGÍNIO, C.G. ; TEIXEIRA, M. F. S . USO DE CÉLULAS DE LINHAGEM TIGEF PARA CULTIVO E PRODUÇÃO DE LENTIVÍRUS OVINO. **Ciência Animal**, Ceará, v. 14, n. 2, p. 69-75, 20 jul. 2004.